

氏名（本籍）	加藤 良規	（東京都）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	甲 第84号	
学位授与年月日	平成14年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Potentialities of <i>N</i> -succinyl-chitosan as a drug carrier for water-soluble macromolecular prodrugs	
論文審査委員	主 査	教授 町 田 良 治
	副 査	教授 高 山 幸 三
	副 査	助教授 高 橋 典 子

論文内容の要旨

【目的】キトサンの誘導体である *N*-succinyl-chitosan (Suc)は、安全性が高く血中滞留性に優れていることが見出されている。この性質に基づき、水溶性薬物担体としての Suc の可能性について検討を行った。本研究では、まず、長時間にわたり Suc の体内動態について検討した。次に、カルボキシル基を有する高分子は、マイトマイシン C (MMC)と容易に結合でき、プロドラッグとして機能する可能性があることが知られていることから、十分な薬物含有率が得られ、かつ水溶性高分子プロドラッグとして機能する結合体について探索を行った。さらに、探索によって得られた結合体について抗癌活性を調べ、高分子の体内動態との関連について検討を行った。一方、肝臓にはガラクトース末端を認識するレセプターがあることが知られており、このレセプターを利用した能動的ターゲティングが数多く報告されている。そこで、肝転移癌へのターゲティングを目的として、ラクトースで修飾した Suc (Lac-Suc)を調製し、その肝指向性薬物担体としての可能性についても検討した。また、Suc および Lac-Suc について、肝転移癌移植後の投与時期による肝集積性の相違、単回及び複数回投与による Lac-Suc の肝集積性の相違について比較検討した。さらに、Suc および Lac-Suc を薬物担体とする MMC の高分子プロドラッグを調製し、肝転移癌モデルマウスにおける延命効果を単回及び複数回投与について検討した。

【方法】Suc、Suc(II)及び Lac-Suc の体内動態については、各担体をフルオレセインイソチオシアネート(FITC)により蛍光標識化して検討を行った。以下、各蛍光標識体は、それぞれ Suc-FTC、Suc(II)-FTC 及び Lac-Suc-FTC と略す。Suc

と MMC の水溶性結合体を調製するために、まず Suc と過剰の無水コハク酸との反応により、サクシニル化度の高い Suc (Suc(II))を得た。サクシニル化度は、¹H-NMR、元素分析により調べた。Suc(II)の体内動態については、静脈内及び腹腔内投与の両者で調べた。Suc(II)と MMC とを水溶性カルボジイミドを用いて反応させ、水溶性結合体(Suc(II)-MMC)を得た。また、1/15M リン酸緩衝液(pH 6.2, 7.4, 9.0)中及び 20%マウス血漿中で薬物放出性を調べた。つづいて、Suc(II)-MMC について静脈内及び腹腔内投与時の抗腫瘍効果を調べた。Sarcoma 180 固形肉腫細胞を腋窩部に移植(s.c.)した ddY 系雄性マウスに MMC 5 mg/kg、Suc(II)-MMC 10 mg/kg を静脈内及び腹腔内投与し、経日的に $L \times W^2/2$ (L:長径, W: 短径)により腫瘍体積を測定し、腫瘍体積の増加抑制率を抗腫瘍効果の指標とした。また、副作用は体重減少から評価した。薬効評価は、投与回数による相違(1 回及び 3 回投与)についても検討した。

Lac-Suc は、Suc にラクトースを還元アミノ化により導入して調製した。正常及び M5076 細胞を移植(i.v.)した C57BL/6 マウスに、単回投与においては 0.8 mg を移植 3 日後に、複数回投与においては 0.2 mg を移植 3 – 6 日後の 4 日間連続で投与(i.v.)し、肝集積性を調べた。Lac-Suc と MMC との水溶性結合体(Lac-Suc-MMC)も、Suc(II)と同様にカルボジイミド法により調製した。Lac-Suc-MMC についても、1/15M リン酸緩衝液(pH 6.0, 9.0)中及び 20%マウス血漿中で薬物放出性を調べた。抗癌活性は、M5076 細胞を移植(i.v.)した肝転移癌モデルマウスを用いて、MMC, Lac-Suc-MMC 及び Suc(II)-MMC を、それぞれ単回(4 mg eq. MMC/kg × 1 day)及び複数回(1 mg eq. MMC/kg × 4 days)投与した後の延命効果から評価した。さらに Lac-Suc-MMC 及び Suc(II)-MMC に関しては、4 mg eq. MMC/kg の 4 日間連続投与についても検討した。また、Lac-Suc-MMC 及び Suc(II)-MMC を投与し、投与後 8, 24 時間における MMC の分布についても検討した。

【結果・考察】 Suc-FTC は、正常マウスの場合、静脈内投与 72 時間後もおよそ 26%と高い血中滞留性を示し、他臓器への移行もあまり見られなかった(Fig. 1)。一方、Sarcoma 180 移植担癌マウスでは、腫瘍部位に約 12%移行した(Fig. 2)。すなわち、血中半減期はそれぞれ 100 時間及び 43 時間であった。このことから、Suc は血中滞留性の高い有用な薬物担体となり得る可能性が示された。高い薬物含有率を得るには MMC/EDC による反応が適していると考えられ、その際に伴う架橋形成を抑制するべく、サクシニル化度の高い Suc(II)と反応させることにより、水溶性の結合体(Suc(II)-MMC)を得ることができた

(Fig. 3)。Suc(II)-FTC は、静脈内投与後 Suc-FTC と同様の体内動態を示した(Fig. 4)。また腹腔内投与では、投与初期を除き、静脈内投与時と同様の体内動態を示したが、若干他臓器への分布の増加がみられた(Fig. 5)。また尿中排泄は、腹腔内投与で抑制される傾向がみられた(Table 1)。水溶性 Suc(II)-MMC は 10% 以上の薬物結合率のものが得られ、本実験では結合率 12% の結合体を用いた。この水溶性結合体は、pH に依存した放出を示し、50% 放出時間はそれぞれ 98 時間(pH 6.2)、40 時間(pH 7.4)及び 6 時間(pH 9.0)であった(Fig. 6)。また血漿の添加は、放出速度にほとんど影響を及ぼさなかった。Sarcoma 180 固形腫瘍に対しては、MMC の 5 mg/kg 1 回投与で高い腫瘍増殖抑制効果を示したが、3 回投与(4 日毎)では致死的副作用を呈した(Fig. 7)。Suc(II)-MMC は、10 mg/kg 1 回投与では腫瘍増殖抑制効果は低く、3 回投与(4 日毎)で高い腫瘍増殖抑制効果を示した(Fig. 7)。腹腔内投与における効果は、静脈内投与の場合と大差なかったが、副作用が強く現れる傾向が示唆された(Fig. 8)。投与経路が抗癌活性・副作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。静脈内及び腹腔内投与での血中動態・尿中排泄率を比較した結果、腹腔内投与では、血中に移行するまでに放出される MMC に周辺の組織が曝露され得ることや、静脈内投与に比べて尿中排泄率が低く、体内への蓄積が幾分高いことが副作用を強くする要因の一つとして考えられた。また、血中濃度測定の結果から、Suc(II)-MMC が結合体としての高い血中滞留性を備えていることが確認された(Fig. 9)。

pH 6 のリン酸緩衝液中、Suc : ラクトース (1 : 12.8, w/w) の反応条件でラクトサミンの含有率はおおよそ 30% に達した(Fig. 10)。Lac-Suc-FTC は、他臓器に比べ有意に肝臓に分布し、0.2 mg 投与時では静脈内投与後約 1 時間で投与量の 23 % が肝に分布し、48 時間後も分布が確認された(Fig. 11)。また、Suc やガラクトースを直接修飾した Suc と比較しても有意に肝臓に移行した(Fig. 12)。これらのことから、Suc をラクトースで修飾することにより、肝へのターゲティングが実現できる可能性が示唆された。抗癌活性は、Lac-Suc-MMC (MMC 結合率 19.9 %) の少量投与群では、MMC、Suc(II)-MMC 各少量投与群に比べて、わずかながら良好な延命効果が認められた。体内分布の結果を考慮すると、Lac-Suc-MMC は少量複数回投与で、さらに有効性が高まることが推測された。また、移植後の投与時期の相違による肝集積性の比較では、M5076 移植後 3 日目投与(早期)の場合、Lac-Suc-FTC は効率的な肝臓への分布を示した(Table 2)。12 日目投与(後期)では、Lac-Suc-FTC では早期に比べて肝臓への分布量の変化は少なかったが、Suc-FTC では肝臓への高い移行性が示された(Tables 2, 3)。体内分布に対する転移癌の進行の影響

は、Lac-Suc では少ないが、Suc は転移の進行とともに蓄積しやすくなると考えられた。これは Lac-Suc のレセプターを介する分布と Suc の受動的ターゲティングによる分布の特徴の相違が反映されているものと考えられる。Lac-Suc-FTC の肝への移行性は、複数回投与群でより良好な肝集積性が観察された(Fig. 13)。また、投与毎に肝への集積の増加が観察されたが、110 μ g 前後で飽和することが認められた。Lac-Suc-MMC からの MMC 放出については、Suc(II)-MMC と同様に pH に依存した放出曲線が得られた(Fig. 14)。M5076 細胞移植 7 日後投与の場合、各薬物とも単回投与群で、より良好な延命効果が観察された(Table 4)。移植 3 日後投与では、Lac-Suc-MMC 4 mg eq. MMC/kg を単回投与した群と 1 mg eq. MMC/kg を 4 日間連続投与した群との間に有意な差は認められなかった。一方 Suc(II)-MMC では、連続投与において、より高い延命効果が認められた(Table 4)。さらに Lac-Suc-MMC 及び Suc(II)-MMC では、4 mg eq. MMC/kg の 4 日間連続投与で非常に高い延命効果が認められた(Table 4)。Suc(II)-MMC は Lac-Suc-MMC よりも良好な延命効果を示したが、副作用として体重減少が観察された。本研究の結果は、肝転移癌抑制に関して、肝の糖レセプターを介した能動的ターゲティングよりも、循環血への滞留性が高い担体による受動的ターゲティングの方が優れていることを示唆した。MMC の肝臓及び血漿中の分布は、各担体の体内分布と同様の傾向を示すことから、肝臓への MMC の局在化は必ずしも肝転移癌抑制に有利とは言えないことが示唆された。

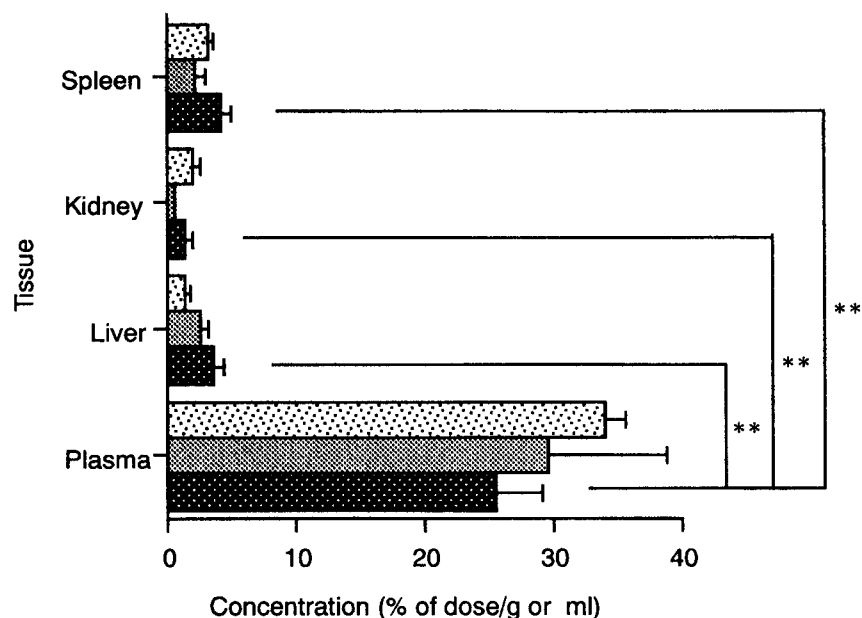


Fig. 1
Plasma concentration and tissue distribution of Suc-FTC after i.v. injection at a dose of 1 mg (0.2 ml) per normal mouse: [dotted], 24 h; [cross-hatched], 48 h; [solid black], 72 h. Each column represents the mean \pm S.D. (n=5). **: $p < 0.01$ for comparison at 72 h after injection.

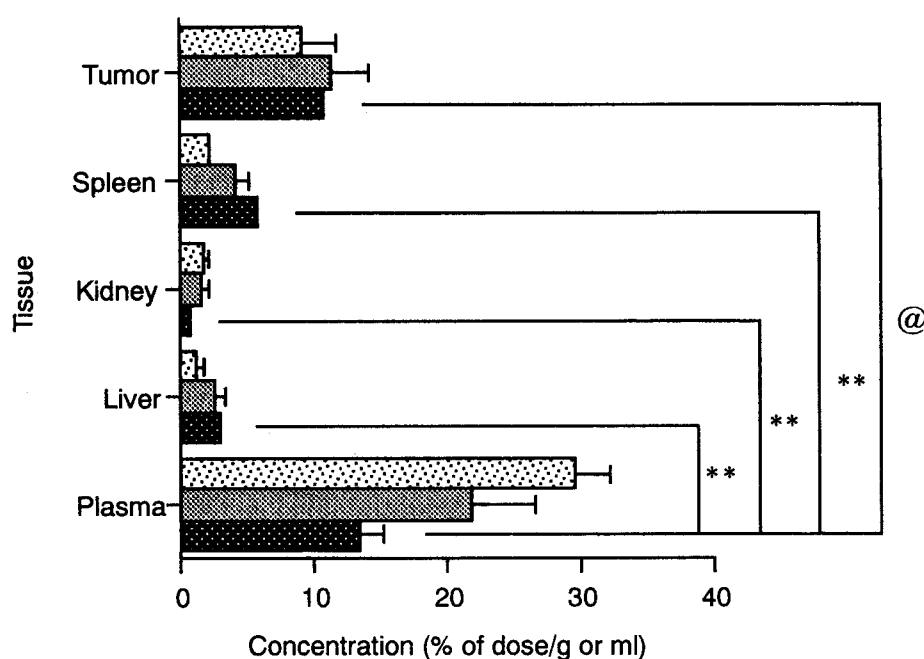


Fig. 2
Plasma concentration and tissue distribution of Suc-FTC after i.v. injection at a dose of 1 mg (0.2 ml) per Sarcoma 180 tumor-bearing mouse: [dotted], 24h; [cross-hatched], 48h; [solid black], 72h. Each column represents the mean \pm S.D. (n=5). **: $p < 0.01$ for comparison at 72 h after injection. @: $p > 0.05$ for comparison at 72 h after injection.

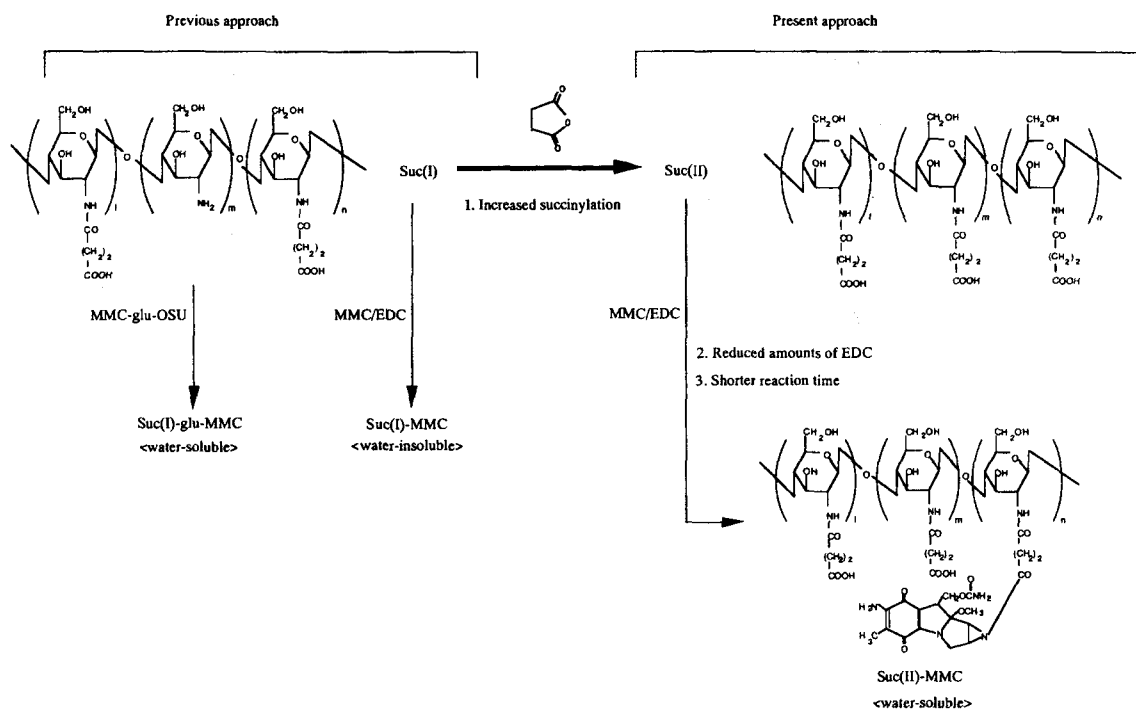


Fig. 3
Synthetic approach for novel water-soluble conjugate of MMC with Suc

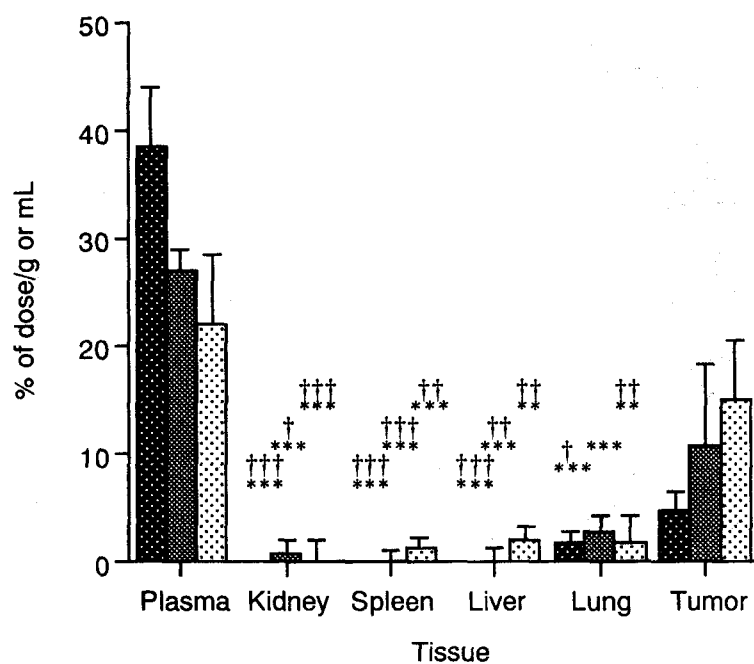


Fig. 4
Plasma concentration and tissue distribution of Suc(II)-FTC after i.v. administration at a dose of 1 mg (0.2 ml) per Sarcoma 180-bearing mouse: ■, 1 h; ▒, 8 h; ▨, 24 h. Each column represents the mean \pm S.D.(n=5). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. plasma. †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$, †††: $p < 0.001$ vs. tumor.

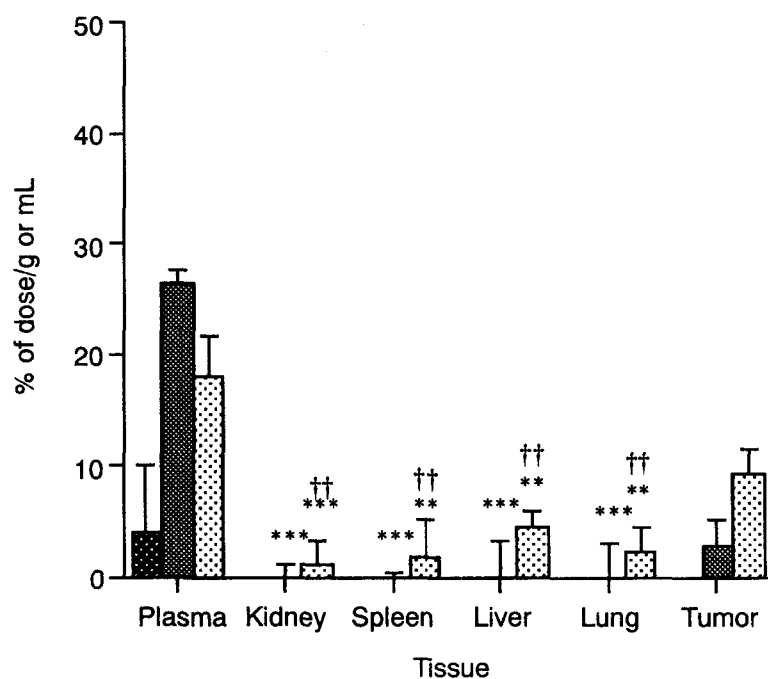


Fig. 5
Plasma concentration and tissue distribution of Suc(II)-FTC after i.p. administration at a dose of 1 mg (0.2 ml) per Sarcoma 180-bearing mouse: ■, 1 h; ▒, 8 h; ░, 24 h. Each column represents the mean \pm S.D. (n=5). **: $p < 0.01$, *: $p < 0.001$ vs. plasma. ††: $p < 0.01$ vs. tumor.**

Table 1
Urinary excretion of Suc(II)-FTC at 8 h and 24 h after i.p. administration in Sarcoma 180-bearing mice

Administration route	Urinary excretion (% of dose) ^{a)}	
	8 h	24 h
i.v.	5.0 \pm 2.3	9.4 \pm 4.1
i.p.	3.0 \pm 2.1	4.9 \pm 3.4

a) Each value represents the mean \pm S.D. (n=5).

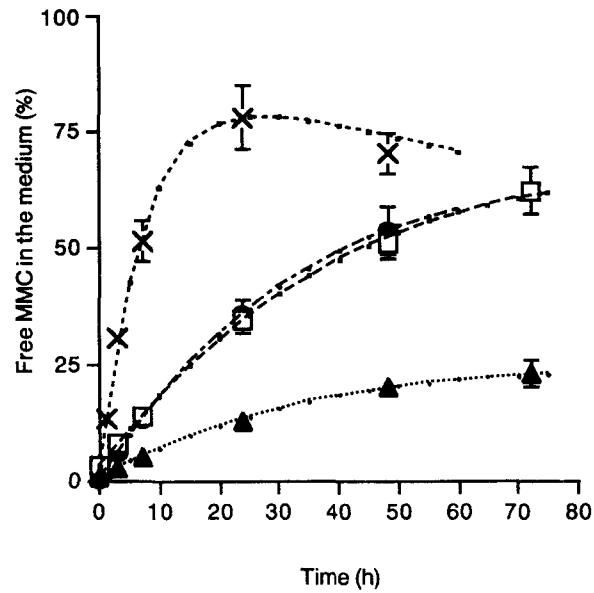


Fig. 6

Release of MMC from Suc(II)-MMC in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.2, 7.4 and 9.0) and the mixture of 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4)-mouse plasma (4:1, v/v) at 37 °C: Δ , pH 6.2; \square , pH 7.4; \times , pH 9.0; \bullet , plasma-buffer mixture. Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

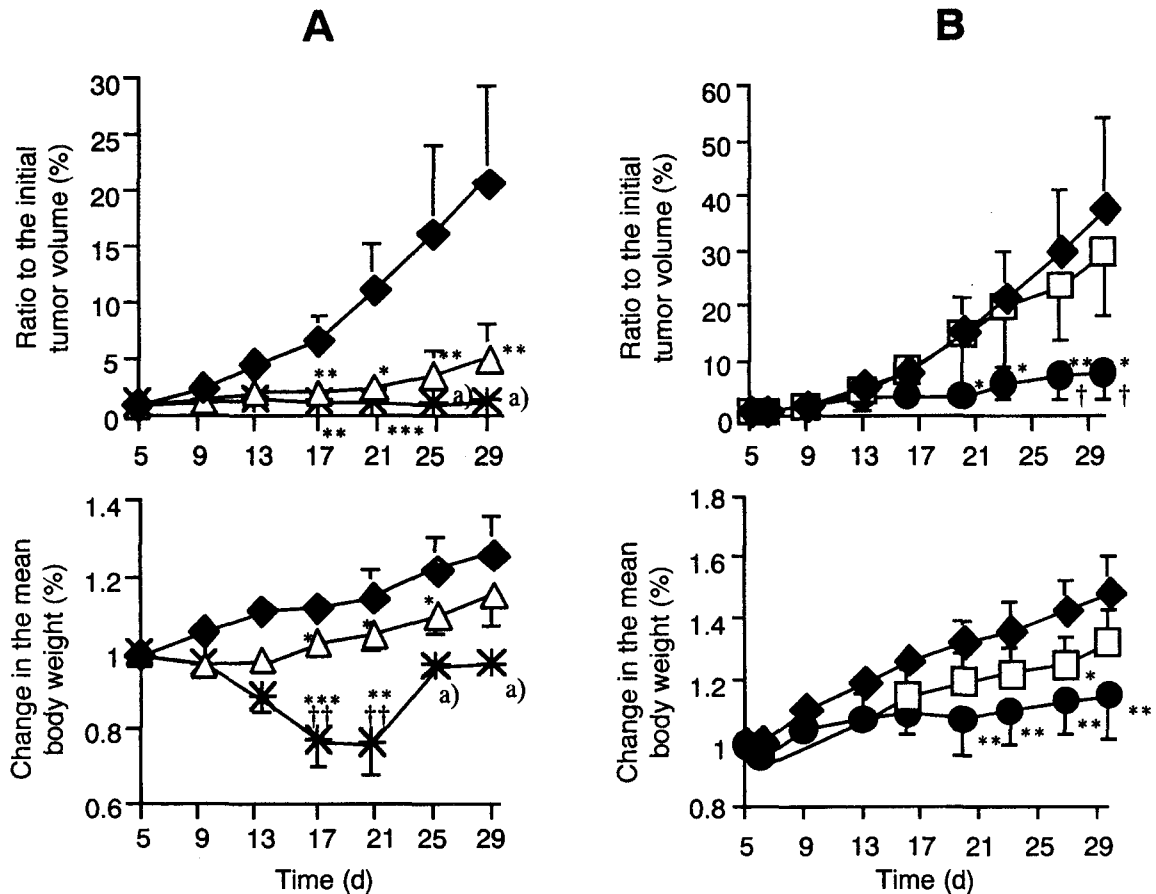


Fig. 7

In vivo growth inhibitory effect against Sarcoma 180 and changes in the body weight of Sarcoma 180-bearing mice after i.v. administration of MMC (A) and Suc(II)-MMC (B): \diamond , Control; \triangle , MMC: 5 mg/kg; \times , MMC: 3 \times 5 mg/kg; \square , Suc(II)-MMC: 10 mg/kg; \bullet , Suc(II)-MMC: 3 \times 10 mg/kg. Sample solution was injected at 5 d after inoculation (single dose), and at 5, 9 and 13 d after inoculation (triple dose). Each point represents the mean \pm S.D. (n=5). a) Four mice died (n=1). *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 vs. control. †:p<0.05, ††:p<0.01 vs. single dose.

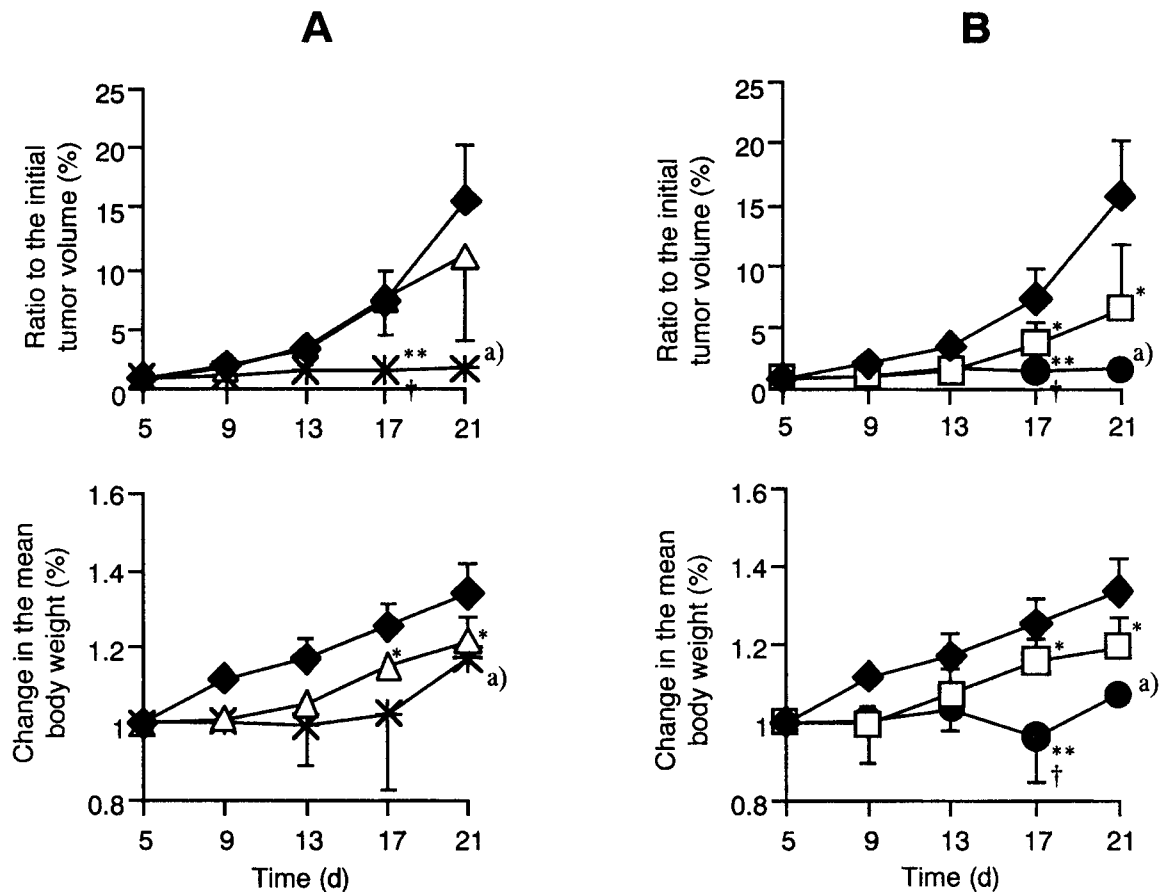


Fig. 8

***In vivo* growth inhibitory effect against Sarcoma 180 and changes in the body weight of Sarcoma 180-bearing mice after i.p. administration of MMC (A) and Suc(II)-MMC (B):** —◆—, Control; —△—, MMC: 5 mg/kg; —*—, MMC: 3 × 5 mg/kg; —□—, Suc(II)-MMC: 10 mg/kg; —●—, Suc(II)-MMC: 3 × 10 mg/kg. Sample solution was injected at 5 d after inoculation (single dose), and at 5, 9 and 13 d after inoculation (triple dose). Each point represents the mean ± S.D. (n=5). a) Four mice died (n=1). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control. †: $p < 0.05$ vs. single dose.

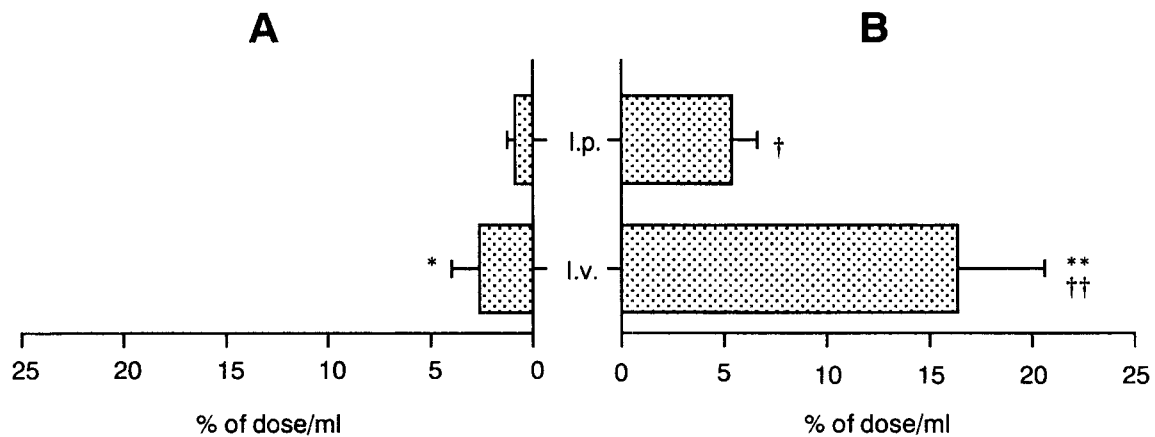


Fig. 9

Plasma concentrations of free (A) and conjugated (B) MMCs at 8 h after i.v. and i.p. administration of Suc(II)-MMC at 10 mg eq. MMC/kg in mice: Each column represents the mean ± S.D. (n=4). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. i.p. injection. †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$ vs. free MMC.

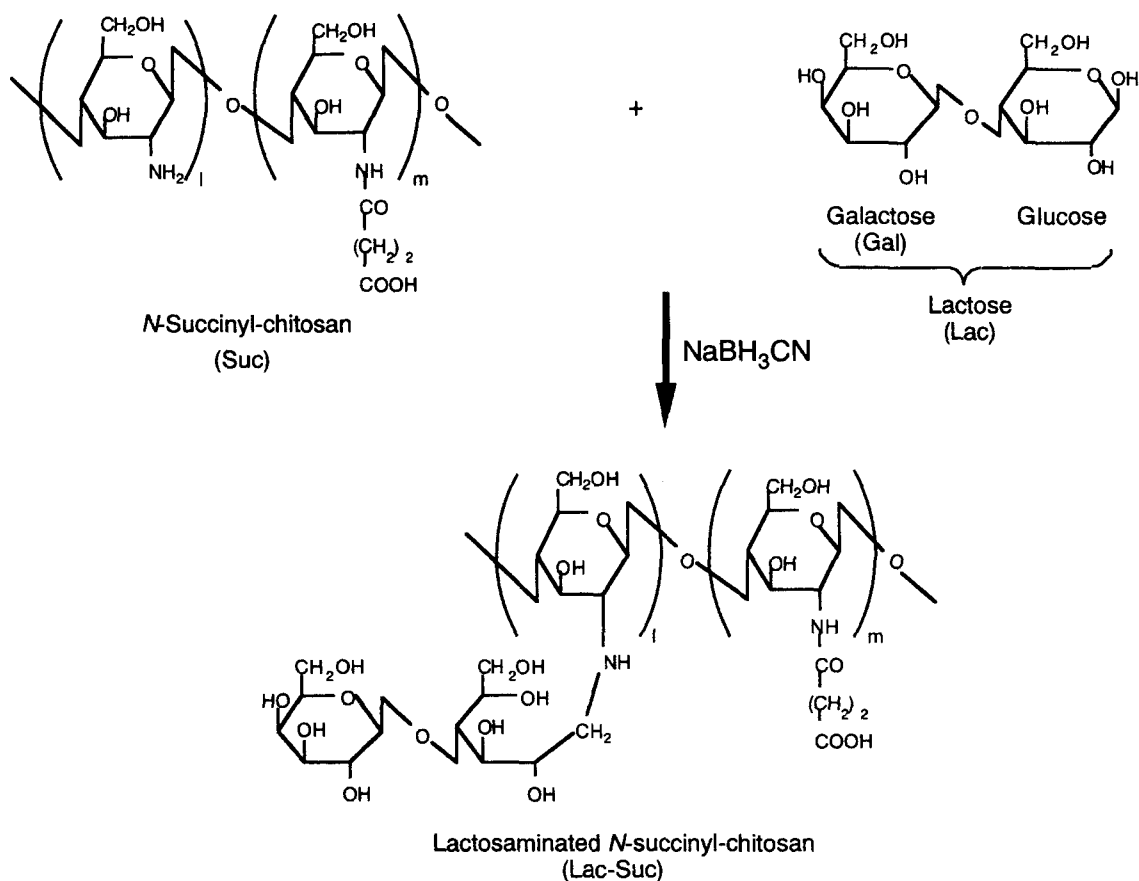


Fig. 10
Synthetic scheme of Lac-Suc

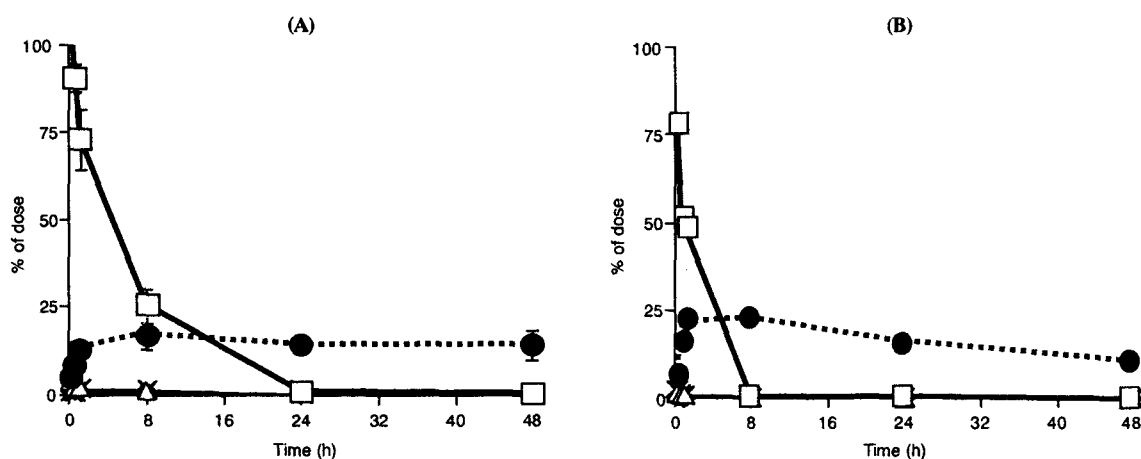


Fig. 11
Plasma concentration and tissue distribution of Lac-Suc-FTC after i.v. administration at a dose of 1 mg (A) or 0.2 mg (B) (0.2 ml) per normal mouse (20 g): \square ; Plasma, \bullet ; Liver, \triangle ; Kidney, \times ; Lung, \diamond ; Spleen. Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

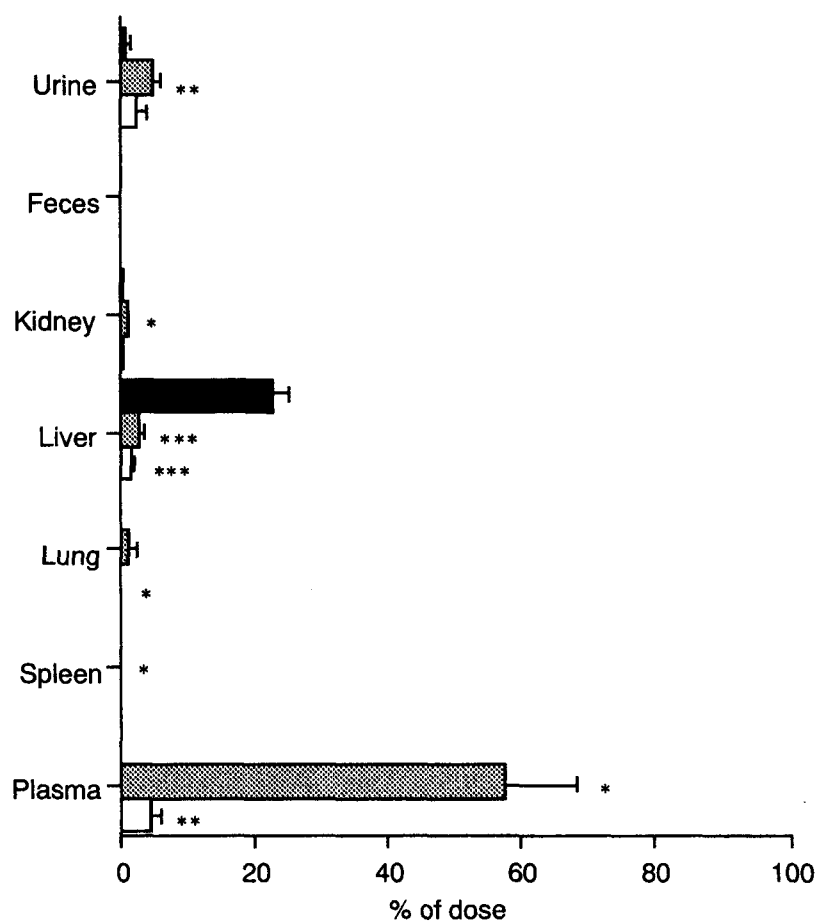


Fig. 12

Comparison of biodistributions among Lac-Suc-FTC, Suc-FTC and Gal-Suc-FTC at 8 h after i.v. administration at a dose of 0.2 mg (0.2 ml) per normal mouse (20 g):

■ ; Lac-Suc-FTC, ▨ ; Suc-FTC, □ ; Gal-Suc-FTC.

Each column represents the mean \pm S.D. (n=3). *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$ vs. Lac-Suc-FTC.

Table 2
Pharmacokinetic parameters of Lac-Suc-FTC after i.v. administration at a dose of 0.2 mg (0.2 ml) per M5076-bearing mouse

Injection day post- inoculation		(A) Concentration			(B) Amount		
		$AUC(C)_{0-48h}$ [h•µg/ml or g]	$MRT(C)_{0-48h}$ [h]	$R(C)_{et}^a$	$AUC(M)_{0-48h}$ [h•µg per mouse]	$MRT(M)_{0-48h}$ [h]	$R(M)_{et}^a$
0 d	Liver	1860	19	3.4	1580	20	3.3
	Plasma	550	1.5		480	1.5	
3 d	Liver	1610	28	2.9	1620	26	3.1
	Plasma	550	7.0		530	6.8	
12 d	Liver	1020	20	2.4	1770	22	4.3
	Plasma	430	2.7		410	2.8	

^a R_{et} means the relative effectiveness of liver targeting, and was calculated using the following equation:

$$R_{et} = \frac{AUC_{0-48h}^{liver}}{AUC_{0-48h}^{plasma}}$$

Table 3
Pharmacokinetic parameters of Suc-FTC after i.v. administration at a dose of 0.2 mg (0.2 ml) per M5076-bearing mouse

Injection day post- inoculation		(A) Concentration			(B) Amount		
		$AUC(C)_{0-48h}$ [h•µg/ml or g]	$MRT(C)_{0-48h}$ [h]	$R(C)_{et}^a$	$AUC(M)_{0-48h}$ [h•µg per mouse]	$MRT(M)_{0-48h}$ [h]	$R(M)_{et}^a$
3 d	Liver	320	28	0.05	280	26	0.05
	Plasma	6270	21		5770	21	
12 d	Liver	640	29	0.25	1340	28	0.52
	Plasma	2530	9.9		2600	9.9	

^a R_{et} means the relative effectiveness of liver targeting, and was calculated using the following equation:

$$R_{et} = \frac{AUC_{0-48h}^{liver}}{AUC_{0-48h}^{plasma}}$$

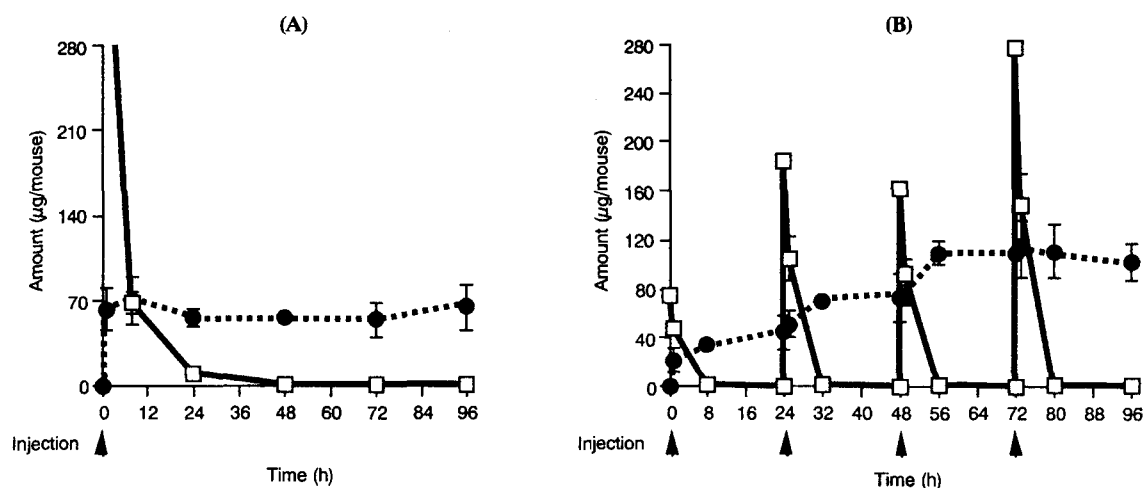


Fig. 13

Plasma level and accumulation of Lac-Suc-FTC to the liver after i.v. administration at a dose of 0.8 mg \times 1 d (A) or 0.2 mg \times 4 d (B) per M5076-bearing mouse: $\text{—}\square\text{—}$; plasma, $\cdots\bullet\cdots$; liver. The arrow shows i.v. injection. At 3 d after i.v. inoculation, test substance (0.2 ml) was injected intravenously. Each point represents the mean \pm SD ($n = 4 - 5$).

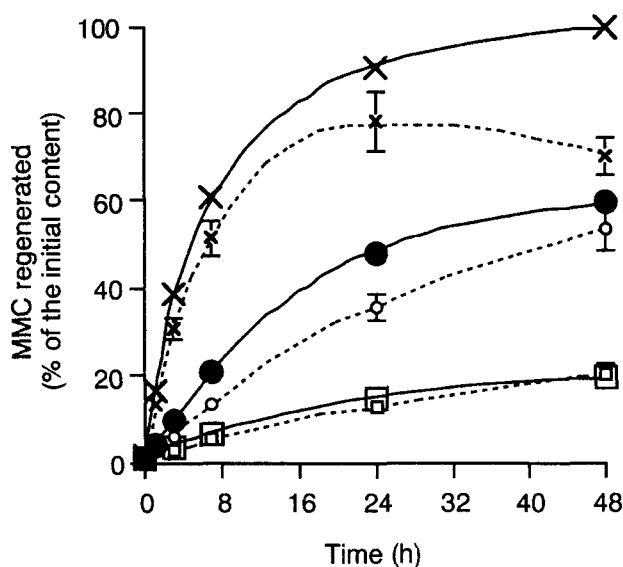


Fig. 14

Release of MMC from Lac-Suc-MMC and Suc(II)-MMC in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0 and 9.0) and the mixture of 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4)-mouse plasma (4 : 1, v/v) at 37 °C: \square , pH 6.0; \times , pH 9.0; \bullet , \circ , plasma-buffer mixture. Each point represents the mean \pm SD ($n = 3$). Large symbols show the release of MMC from Lac-Suc-MMC, whereas small symbols show that from Suc(II)-MMC.

Table 4
ILS values of MMC, Suc(II)-MMC and Lac-Suc-MMC in different schedules

Administration schedule	Substances	Single administration ^a		Repeated administration ^b	
		Dose	ILS (%)	Dose	ILS (%)
7 d post-inoculation	Control	—	—	—	—
	MMC	4 mg/kg × 1 d	59.5 **	1 mg/kg × 4 d	0
	Suc(II)-MMC	4 mg/kg × 1 d	54.8 **	1 mg/kg × 4 d	3.6
	Lac-Suc-MMC	4 mg/kg × 1 d	23.8	1 mg/kg × 4 d	-6.0
3 d post-inoculation	Control	—	—	—	—
	MMC	4 mg/kg × 1 d	98.6 **	1 mg/kg × 4 d	18.8 **
	Lac-Suc-MMC	4 mg/kg × 1 d	56.5 **	1 mg/kg × 4 d	42.0 *
	Lac-Suc	(16 mg/kg) ^c	8.7		
	Lac-Suc + MMC	4 mg/kg × 1 d	156.5 **		
	Control	—	—	—	—
	MMC	4 mg/kg × 1 d	37.8 **		
	Suc(II)-MMC	4 mg/kg × 1 d	> 97.3 **	1 mg/kg × 4 d	> 185.1 **
	Suc(II)	(29 mg/kg) ^c	16.2		
	Suc(II) + MMC	4 mg/kg × 1 d	> 91.9 **		
	Control			—	—
	Suc(II)-MMC			4 mg/kg × 4 d	> 192.5 **
	Lac-Suc-MMC			4 mg/kg × 4 d	118.8 **

^a At 3 or 7 d post-inoculation, each substance was intravenously administered at a dose of 4 mg/kg.

^b Each substance was intravenously administered repeatedly at a dose of 1 mg/kg on each of days 3 - 6 or 7 - 10 post-inoculation.

^c Lac-Suc or Suc(II) was administered at a dose of 16 or 29 mg polymer eq/kg, respectively.

*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. control [Mantel-Cox log-rank test].

論文審査の結果の要旨

本論文は高い安全性と優れた血中滞留性を有することが知られているN-succinyl-chitosan (Suc)を水溶性薬物担体として応用すべく行われた、広範かつ詳細な検討に基づくものである。

まず、Sucをフルオレセインイソチオシアネート(FITC)で蛍光標識化したSuc-FITCについて、体内動態を調べた。その結果、正常マウスでは静脈内投与後長時間にわたって高い血中滞留性を示し、Sarcoma180移植担癌マウスでは腫瘍への移行性を確認し、Sucが薬物担体として有用であり得ることを示した。

ついで、水溶性の高いマイトマイシンC(MMC)とSucとの結合体を得るため、サクシニル化度の高いSuc(Suc(II))を調製し、水溶性カルボジイミドを用いてMMCと反応させた結果、薬物結合率が10%以上のSuc(II)-MMCを得ることができた。Suc(II)-MMCからの薬物放出をリン酸緩衝液中で検討したところ、pH依存性の放出を示すことが確認され、pH6.2、7.4、9.0での50%放出時間はそれぞれ98、40、6時間であった。つぎにSuc(II)-MMCをSarcoma180移植担癌マウスに静脈内及び腹腔内投与して抗腫瘍活性を調べたところ、10mg/kg1回投与ではMMCの5mg/kg1回投与に及ばなかったものの、4日毎に3回投与すると高い腫瘍増殖抑制効果が示された。また、腹腔内投与では副作用が強くなる傾向から、投与経路が主作用・副作用に影響を及ぼし得ることを見いだした。

さらに、ガラクトース末端を認識するレセプターが肝臓に存在することから、還元アミノ化によりSucをラクトースで修飾したLac-Sucを調製した。Lac-Sucを正常マウス及びM5076細胞移植マウスに単回及び複数回静脈内投与して、肝集積性を調べた結果、他臓器に比較して肝臓に有意に多く分布することを確認した。この結果を受け、Lac-SucとMMCとの水溶性結合体Lac-Suc-MMCを調製し、MMC、Suc(II)-MMCとともに、M5076細胞を移植した肝転移癌モデルマウスを用いて抗癌活性の評価を行った。少量投与ではLac-Suc-MMCがMMC、Suc(II)-MMCに比較してわずかに良好な延命効果が認められ、Lac-Sucの肝集積性を考慮するとLac-Suc-MMCは少量複数回投与での有効性が高くなるという推論に達した。また、腫瘍細胞移植後の投与時期によって有効性に差が生じることを確認したほか、単回投与と複数回投与の相違についても検討し、Lac-Suc-MMCおよびSuc(II)-MMCが4mg eq.MMC/kgの4日間連続投与において著しく高い延命効果を示すことを明らかにした。総合的に見て、Suc(II)-MMCがLac-Suc-MMCより良好な延命効果を示したことから、本研究で作成した肝転移

癌モデルでは肝臓に存在する糖レセプターを介する能動的ターゲティングより、循環血中での滞留性に優れた担体を用いる受動的ターゲティングの方が優れた転移癌抑制効果を示すことを明らかにした。

本論文は、明確な研究目的のもと、適正な方法論に基づいて得られた重要な知見を的確に解析している。また、新規な水溶性プロドラッグを調製し得たのみならず、移植後の投与時期の影響や複数回投与の効果を明らかにするなど、癌化学療法分野に貢献しうる貴重な情報を提供している。よつて、博士(薬学)の学位論文に十分値するものと判定した。